

氏 名	中 沢 寛 光
学 位 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士（理学）
学 位 記 番 号	乙理第63号（文部科学省への報告番号乙第368号）
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	2015年7月15日
学 位 論 文 題 目	極低照射量電子線回折法および放射光X線回折法によるヒト皮膚角層微細構造と水分透過性の関係解析
論文審査委員	（主査） 教 授 水 木 純一郎 （副査） 教 授 高 橋 功 教 授 加 藤 知 八 田 一 郎（名古屋大学名誉教授）

ヒトの体表面を覆っている皮膚は、外部からの異物の侵入に対するバリアであると同時に、体内からの水分蒸散を制御するインテリジェント・フィルターとして機能している。こうした皮膚の物質透過を考える上で、最表面に位置する厚さ10 μm ほどの薄層である角層が大きな役割を担っていると考えられており、角層の微細構造と物質透過性の関係についての研究が精力的に行われてきた。しかし、動物実験に対する倫理的規制やヒト皮膚から適当な試料を自由に得ることが困難なこと、採取試料が微量であるため高感度の構造解析手法が必要なこと、また個体差が大きいことや物質透過性には複数の要因が関与していることなどにより、角層の特定の微細構造が物質透過性とどのように関係しているかは、推測の域を出ていない。著者は、これらの問題を打開するために、電子線回折とX線回折を用いた新たな構造解析手法の開発を行っている。倫理的問題に抵触せず、非侵襲的に採取した多様な角層試料を用いて構造解析実験できる電子線回折法では、高感度カメラを用いて電子線照射量を減らして回折像を取得することにより、従来よりも簡便に大量のデータを解析することを可能にし、試料採取部位によるヒト角層構造の違いを明らかにしている。また、放射光を用いたX線回折法では、配向性を保ったシート状の角層試料から回折像を取得することに成功し、角層シートの水分透過性と脂質分子の側方充填構造の温度依存性が相関していることを両者の同時測定により明らかにしている。ここに得られた結果は、角層の微細構造が物質透過性にどのように関係しているか考える上で重要な基礎的知見を与えるものであり、高く評価できる。

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、ヒト皮膚角層の微細構造と水分透過性の関係を明らかにするために、電子線回折法と放射光X線回折法の新たな手法を開発し、両者の関係について詳細に解析を行ったものである。電子線回折法では、高感度デジタルカメラを検出器とし、電子線照射が角層細胞間脂質層内の脂質分子側方充填構造に及ぼす影響を定量的に評価している。これにより、従来よりも格段に低い電子線照射量で回折像を取得することにより、室温でも電子線による損傷を無視できることを明らかにしている。この新たに開発した極低照射量電子線回折法では、接着剤を塗布した電子顕微鏡用メッシュ上にほぼ非侵襲的に皮膚表面から採取した微量の角層試料を用いて、簡便に統計解析できる数の回折像を取得できる。この特長を生かして、試料採取部位による角層構造の違いが、経皮水分蒸散量とどのように関係しているか解析している。取得したデータを定量的

に効率よく解析するために、1次元化した回折プロファイルを2階微分して弱い回折ピークの有無を判定する手法や回折ピークがどの程度スポット状に現れるかを評価するための新たな指標などを提案している。これらの解析により、腕では額や頬に比べて脂質分子側方充填構造が統計的にヘキサゴナル構造よりもオーソロンビック構造をとる割合が有意に多いという結果を得ている。また、経皮水分蒸散量との相関の解析では、オーソロンビック構造の割合およびバックグラウンドの形状を特徴づけるパラメータと経皮水分蒸散量に比較的高い負の相関があることを見出している。

放射光 X 線を用いた回折実験では、美容整形手術で切り出されたシート状の角層試料を材料として、細胞間脂質層の層周期に関する情報が得られる小角回折と脂質分子側方充填構造に関する情報が得られる広角回折の実験を行っている。まず、角層内の水分量が角層構造に与える影響を水分量をコントロールした試料を準備して評価している。その結果、構造パラメータの水分量に対する依存性のプロファイルが、健全な皮膚角層における水分量である25wt%に近い20～30wt%の水分量で飽和したり、極値をもつことを見出している。さらに、著者は試料ごとの構造差の影響を排除して、水分蒸散量と角層構造の関係を解析するために、両者を同時に測定するための試料セル(外部環境2分型試料セル)の開発を行っている。開発されたセルでは、配向性を保った角層シートを X 線入射方向に対して斜めに設置し、試料の表裏の外部環境を独自に制御できるように工夫されている。これにより角層シートの下部に設置した水槽から上部に透過してきた水分量を X 線回折実験と同時に計測することが可能となった。開発した試料セルを用いて、角層構造と水分蒸散量の温度依存性の同時測定を行い、角層細胞間脂質層における脂質分子側方充填構造の温度相転移と並行して水分蒸散量の変化が起こることを見出している。

本論文は、これまで困難であった非侵襲的に採取した角層試料の構造解析を簡便に大量に行うことを可能とすると同時に、角層構造と物質透過性の評価を同時に計測して、直接的に両者の関係を明らかにしていくための手法を提供しており、今後の皮膚角層の機能と構造の関係を解析していく上で新たな展望を開くものである。

論文審査結果の要旨

本論文は、大きく二つの部分から構成されている。前半では、非侵襲的にヒト皮膚表面から採取した角層試料に対して、従来よりも非常に少ない電子線照射量で電子線回折実験を行い、試料採取部位による構造の違いを明らかにしている。これまでのヒト皮膚角層の電子線回折実験では、電子線損傷の影響を低減するために液体窒素温度に冷却して観測するなど手順が煩雑で大量のデータ処理には適していなかったが、本研究では、極低照射量の電子線で回折像を取得することにより、室温でも信頼性の高い回折像が得られる手法を開発しており、今後統計的処理を必要とする解析への応用が期待される。開発された手法では、単に電子線照射量を低減しただけでなく、試料採取方法やデータ解析方法の改良も行っており、解析結果の信頼性も高い。これらは、著者が手法の問題点を的確に把握し、課題解決していく高い能力をもっていること示している。

さらに、著者は各試料採取部位における水分蒸散量を測定し、角層構造の違いとどのように関係しているかを解析し、角層細胞間脂質層における脂質分子側方充填構造がオーソロンビック構造をとる割合と経皮水分蒸散量が負の相関を示すことを見出している。オーソロンビック構造の割合が角層の水分透過性と相関していることを示すデータは、これまでも報告されているが、いずれも間接的な証拠に基づくものであり、最終的な結論には至っていない。本研究で得られた結果は、多数のデータの統計的な処理に基づいて有意差判定をしたものであり、信頼性が高く、未決着の問題に重要な知見をあたえ、新たな展望を開くものとして高く評価できる。

放射光 X 線を用いた回折実験では、輝度の高い SPring-8 のビームライン (03XU) の特性を利用し、広げ

た1枚の角層シートに斜めにX線を入射して明瞭な回折像を取得することに成功している。ここで採用された試料の配置は、角層のX線回折実験で通常使用されているものとは異なる独創的なものである。これは、著者が角層の内部構造に精通しているとともに、既存の概念に囚われず柔軟な発想ができることを示している。さらに、著者はこうした配向性を保った試料配置が可能となったことを利用し、角層シートを透過する水分量を回折実験と同時に計測するための試料セル（外部環境2分型試料セル）を開発している。これにより、上記した脂質分子側方充填構造の変化と水分透過性が相関していることを、側方充填構造の温度相転移を利用して直接的に示す結果を得ている。本研究で得られた結果は、角層細胞間脂質層の構造と物質透過性の関係を解明していく上で、基礎的知見を与えるものであり、今後の研究の進展に大きく寄与するものとして高く評価できる。

著者は、本論文の内容に関連した皮膚角層の構造に関する論文を、6編（内筆頭著者3編）を *Biochim. Biophys. Acta* や *Chem. Phys. Lipids* などに公表している。他に2編の人工脂質膜に関する共著論文が公表されている。審査委員は、本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた技法について深く理解していること、また関連する分野についても幅広い学識を有することを確認することができた。また、公表論文はすべて英文で書かれていることや国際学会での多数の発表経験があることより、国際的な研究環境において英語で情報発信していく十分な能力を有すると判定した。さらに、科研費等の外部資金の取得、企業との共同研究、特許取得など豊富な実績もあり、自立した研究者として研究を遂行していく高い能力を有していると評価できる。以上より、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定した。

2015年7月10日